

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАПНА-АМИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БОЛЬНЫХ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Моисеева А.М.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Введение. В последние годы нарастает интерес к изучению антител с каталитической активностью (абзимов). Определение абзимной активности иммуноглобулинов является одним из новых перспективных направлений в лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний. Особое значение придается оценке специфических видов абзимной активности, в частности, нуклеазной и протеолитической [1]. Достоверно установлена взаимосвязь между возникновением и прогрессированием аутоиммунных, онкологических заболеваний и уровнем протеолитической активности антител [1,4,5]. Кроме того, опубликованы данные об отрицательной взаимосвязи БАПНА-амидазной активности антител с тяжестью процесса при хронических вирусных гепатитах В и С [1]; установлено положительное влияние протеолитических абзимов на благоприятный исход при сепсисе [3]. Все эти, а также другие данные подтверждают участие антител с каталитической активностью в развитии аутоиммунной, онкологической и системной инфекционной патологии [1]. Многие авторы [1,2] склоняются к тому, что мониторинг абзимной активности (в том числе протеолитической) может иметь важное значение в прогнозировании течения и исхода заболевания. В современной лабораторной практике для оценки протеолитической активности широко применяется БАПНА-амидазная реакция вследствие ее специфичности и хорошей воспроизводимости [2]. Нами была разработана чувствительная и точная методика оценки БАПНА-амидазной активности, при которой определение концентрации продукта реакции (п-нитроанилина) проводится методом ВЭЖХ.

Цель работы: апробация разработанной ВЭЖХ методики оценки БАПНА-амидазной активности иммуноглобулинов.

Материалы и методы. В работе использовали субстанции БАПНА («Sigma», Германия), п-нитроанилин (пр-ва ИБОХ НАНУ,

Украина), трипсин («СПОФА», Чехия). Растворы БАПНА готовили с использованием диметилсульфоксида («Фармтехнология», РБ). Для приготовления подвижной фазы для ВЭЖХ применяли ацетонитрил (сорт для ВЭЖХ, «Криохром», Россия) и бидистиллированную воду.

Растворы п-нитроанилина с концентрацией 100; 50; 30; 10; 5; 3; 1; 0,5; 0,3; 0,1 мкг/мл использовали для построения калибровочного графика зависимости отклика детектора хроматографа (площадь пика вещества на хроматограмме) от концентрации п-нитроанилина во вводимой пробе.

Для построения градуировочного графика зависимости ферментативного расщепления БАПНА от концентрации трипсина в пробе использовали растворы с постоянной концентрацией БАПНА (500 мкг/мл) и различными концентрациями трипсина (50; 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 мкг/мл), приготовленные последовательным разведением. В качестве контроля использовали раствор БАПНА без добавления трипсина.

Препараты IgG получали из сыворотки крови больных кишечными инфекциями методом аффинной хроматографии на агарозе с протеином А золотистого стафилококка.

Для постановки реакции определения БАПНА-амидазной активности IgG сыворотки крови больных к 1,00 мл раствора БАПНА добавляли 1,00 мл растворов IgG с концентрацией 1 мг/мл, инкубировали при 37°C в течение 20 часов.

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100. Разделение проводилось на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-18 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: ацетонитрил и вода 20:80 (по объему), скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем вносимой пробы 50 мкл, рабочая длина волны 380 нм.

Результаты и обсуждение. Была проведена оценка БАПНА-амидазной активности IgG двадцати больных кишечными инфекциями (шигеллез, сальмонеллез). Расчет каталитической активности производили при помощи градуировочного графика зависимости расщепления БАПНА от концентрации фермента по формуле:

$$X = (S_{\text{оп}} - S_{\text{кон}}) \times a \times 3,15/t,$$

где X - активность фермента, МЕ; $S_{\text{оп}}$ - площадь пика п-нитроанилина на хроматограмме опытной пробы; $S_{\text{кон}}$ - площадь пика п-нитроанилина на хроматограмме контроля; a - коэффициент, равный 0,0000015 мкмоль (см. выше); 3,15 - коэффициент

соотношения молярных масс БАПНА и п-нитроанилина, t – время инкубации, мин.

В восьми случаях из двадцати получили достоверное отличие от контроля. В этих пробах активность иммуноглобулинов у больных сальмонеллезом составила $26,96 \times 10^{-7}$, $14,49 \times 10^{-7}$, $10,06 \times 10^{-7}$, $8,32 \times 10^{-7}$, $7,55 \times 10^{-7}$ МЕ, у больных шигеллезом – $4,18 \times 10^{-7}$, $3,35 \times 10^{-7}$, $3,09 \times 10^{-7}$ МЕ.

Методика оказалась хорошо воспроизводимой (коэффициент вариации внутри одного определения – 2,46%, между анализами – 5,41%).

Проведенная оценка БАПНА-амидазной активности препаратов IgG, полученных от больных кишечными инфекциями, показала достоверное наличие абзимной активности антител у части лиц данной группы. Это подтверждает возможность использования разработанного метода в клинической практике. Кроме того, с помощью предложенной методики возможно исследование каталитической активности других биологических жидкостей организма (сыворотки крови, синовиальной жидкости и т.д.).

Выводы.

1. Разработанная методика ВЭЖХ определения БАПНА-амидазной активности благодаря высокой чувствительности и точности может применяться для качественного и количественного анализа специфической протеолитической активности иммуноглобулинов в лабораторных исследованиях.

2. Установленное наличие БАПНА-амидазной абзимной активности антител у части больных кишечными инфекциями подтверждает возможность использования разработанного метода в клинической практике.

Литература:

1. Генералов, И. И. Абзимная активность иммуноглобулинов / И. И. Генералов – Витебск: Издательство ВГМУ, 2000.

2. Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов класса G: инструкция по применению / В. К. Окулич [и др.] – Минск: МЗ РБ, 2002. – Пер. № 6-0101.

3. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis / S. Lacroix-Desmazes [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – N 102(11). – P. 4109-4113.

4. Natural Catalytic Antibodies: Peptide-hydrolyzing Activities of Bence Jones Proteins and V_L Fragment / S. Paul [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1995. – N 25. – P. 15257 – 15261.

5. Hydrolysis of myelin basic protein by IgA and IgM antibodies from sera of patients with multiple sclerosis / D. I. Polosukhina [et al.] // Medical Science Monitor. – 2005. – N 11(6). – P. 1-7.